

INMUNODETECCIÓN DE LA BACTERIA *Leifsonia xyli* subsp *xyli* EN CLONES COMERCIALES DE *Saccharum* spp. EN TABASCO, MÉXICO

IMMUNODETECTION OF THE *Leifsonia Xyli* ssp. *Xyli* BACTERIA IN COMMERCIAL CLONES OF *Saccharum* spp. IN TABASCO, MEXICO

García-Juárez, H.S.¹; Ortiz-García, C.F.^{1*}; Salgado-García, S.¹; Valdez-Balero, A.¹; Silva-Rojas, H.V.²; Ovalle-Saenz, W.R.³

¹Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina S/N, 86500. H. Cárdenas, Tabasco, México. Grupo MASCA.A-LPI-2: AEES. ²Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Texcoco 56230, Estado de México. ³Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Carretera Escuintla-Mazatenango km. 92.5, Santa Lucía, Escuintla, Guatemala.

*Autor responsable: cfortiz@colpos.mx

RESUMEN

Se evaluó el método de inmunoensayo de adsorción de gota para determinar la presencia de la bacteria *Leifsonia xyli* subsp *xyli* en cinco clones comerciales cultivados de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) para determinar su distribución en el área cañera de la Chontalpa, mediante 105 sitios de muestreos en dicha zona. El método de inmunoensayo fue informativo, se detectó la bacteria atacando a los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11 con incidencias de 0 a 10% para los tres primeros clones y de 0 a 30% para el último clon. Las plantaciones positivas se distribuyeron formando tres focos en el sur de la zona cañera.

Palabras claves: Inmunoensayo de adsorción de gota, RDS, *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, caña de azúcar.

ABSTRACT

The drop adsorption immunoassay method was evaluated to determine the presence of the *Leifsonia xyli* ssp. *xyli* bacteria in five commercial cultivated sugar cane (*Saccharum* spp.) clones, to determine its distribution in the sugar cane area of Chontalpa, through 105 sampling sites in that zone. The immunoassay method was informative; the bacteria was detected attacking the clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 and RD 75-11 with incidence of 0 to 10% for the first three clones and 0 to 30% for the latter clone. The positive plantations were distributed forming three focuses in the south of the sugar cane zone.

Keywords: Drop adsorption immunoassay, RDS, *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, sugar cane.



INTRODUCCION

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo muy importante económicamente en el trópico y sub trópico por su alta productividad, eficiente uso de insumos y facilidad de procesamiento de productos y subproductos (Moore, 2014). En México se cultivan anualmente 780,254 ha, con un rendimiento promedio de 75.63 t ha⁻¹; en el estado de Tabasco, México, se cultivan 36,287 ha, con bajos rendimientos promedio de 56.47 t ha⁻¹ (INFOCAÑA, 2014); 25% menos que la media nacional. Salgado et al. (2009) mencionan que entre las causas de esta baja productividad, entre otros factores, pueden estar problemas fitosanitarios. En los últimos años se confirmó la presencia de patógenos como la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal de la enfermedad conocida como “**escaldadura de la hoja**”, cuya principal forma de diseminación es por uso de partes vegetativas infectadas para siembra importada y no tratadas térmicamente (Silva, 2013). El proceso de diseminación es equivalente para la bacteria *L. xyli* subsp *xyli* (Hoy et al., 1999) agente causa de la enfermedad **Raquitismo de las socas de la caña de azúcar o RSD (Ratoon stunting disease)**; enfermedad que impacta negativamente la producción (Davis, 1980; Hoy et al., 1999), cuya presencia en México ha sido reportada por Flores (1997) desde 1953. La RSD, es una enfermedad desatendida en México por lo complicado que resulta su diagnóstico, debido a los pocos y difíciles síntomas a apreciar tales como, disminución del diámetro de tallos y acortamiento de entrenudos debido al taponamiento vascular (Gillaspie y Teakle, 1989). Ovalle (2012) reporta que las plantaciones infectadas con RSD muestran anualmente una reducción progresiva del rendimiento de campo; debido a la pérdida de vigor y reducción del número de tallos sin mostrar un impacto negativo significativo en el contenido de azúcar del jugo. El RSD fue reportado por primera vez en 1944 en Australia, atacando al clon Q 28; actualmente su presencia está en la mayoría de las áreas productoras de caña de azúcar del mundo, en países y regiones como: Argentina, Brasil, Centro América, Colombia, Cuba, Fiji, Hawaii, India, Indonesia, Jamaica, Kenya, Mauricio, México, Perú, Taiwán y Estados Unidos de América (Davis y Bailey, 2000). Comstock (2002) señala que la pérdida en rendimiento es variable, y depende del clon, condiciones climatológicas y grado de infección de la plantación. Así, las mayores pérdidas de producción se asocian con periodos de sequía y condiciones de estrés, oscilando en clones susceptibles desde 35.4% (clon CP 44-101) hasta 12.7% (clon CP 52-68). Davis et al., (1984) cuantificaron aumento de pérdidas referente a los ciclos de cultivo de 37% en el ciclo de plantilla y 67% en la primera soca del clon Q 28 en Australia. La misma relación se registró en otros clones menos susceptibles donde las pérdidas variaron de entre 10% a 15% en plantilla y de 20% a 25% en socas.

Agente causal. Inicialmente el RSD se le atribuyó a la acción de un virus, debido a que no se asociaba algún patógeno y que el jugo de plantas enfermas mantenían su infectividad. Posteriormente, Davis (1980) mostró que el patógeno era una bacteria corineforme, que coloniza las células del xilema, a la que se le registró como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis et al., 1984). Finalmente, fue reubicada dentro del género *Leifsonia* conservando la es-

pecie y subespecie (Evtushenko et al., 2000). La especie *L. xyli* cuenta con dos subespecies: *L. xyli* subespecie *cynodontis* que afecta a gramíneas y provoca el raquitismo de pasto Bermuda; y *L. xyli* ssp. *xyli* que parasita a la caña de azúcar (Locci, 1994). *L. xyli* subsp. *xyli* es una bacteria gram positiva, no móvil, aeróbica, se divide por fisión binaria transversal, y es un parásito obligado de la planta (Comstock, 2002; Davis, 1980). Existen varios procedimientos para determinar la etiología de una enfermedad (Agrios, 2005), y para la detección y la identificación de este tipo de patógeno se han adoptado métodos serológicos como la inmunofluorescencia, ELISA, inmunoensayo de adsorción de gota (Comstock e Irey 1992; Rao y Singh, 2000), o el PCR reacción en cadena de la polimerasa (Gao et al., 2008; Shen et al., 2006) debido a la difícil detección en campo de plantas enfermas y el complicado proceso para el aislamiento de la bacteria en medio de cultivo (Rott y Davis, 2000). Por lo que probar el método serológico de inmunoensayo de adsorción de gota, determinar la presencia de dicha bacteria y conocer su distribución en los principales clones comerciales cultivados en la zona Chontalpa, fueron los principales objetivos del presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

El estudio, se desarrolló en la zona productora de caña de la Chontalpa, en Tabasco, México (17° 15' y 17° 40' N; 90° 59' y 94° 06' O), con clima es cálido húmedo [Am(i')g], con promedios anuales de temperatura y precipitación de 26 °C y 2163 mm, respectivamente (Salgado et al., 2009); y una superficie cultivada de 29 263 ha de caña de azúcar (INFO-CAÑA, 2014).

Puntos de muestreo: Para detectar la presencia de la bacteria en las plantaciones se realizó un muestreo de tallos de plantaciones comerciales con los clones: MEX 69-290, MEX 79-431, MEX 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11 en el ciclo 2013-2014, enfocado a explorar la heterogeneidad ambiental de la zona cañera de la Chontalpa, para lo cual se combinaron los factores clones con mayor superficie cultivada, tipos de suelo dominantes (Cambisol, Vertisol, Gleysol y Fluvisol), y régimen de precipitación de 1793-1936 mm y de 1937-2085 mm (Salgado *et al.*, 2009). El muestreo incluyó 105 sitios (plantaciones), considerando tres muestras dentro cada combinación de factor. La preubicación de los puntos de muestreo se realizó mediante el programa Arc.GIS versión 9.3; mediante la sobreposición de los plano edafoclimático regional y el de distribución de las plantaciones a escala a 1:50,000 del estudio SIRDIF (Salgado *et al.* 2009).

Toma de muestras: La ubicación en campo de las plantaciones correspondiente a los sitios de muestreo predeterminados se realizó con el apoyo de un GPS (Garmin GPSmap 62) y personal técnico de dos ingenieros, quienes confirmaban, el clon cultivado y meses de desarrollo. Así, en cada plantación mayor a siete meses, de forma sistemática se recolectaron tallos de 10 macollas (plantas) diferentes, siguiendo un esquema de muestreo sistemático y sin hacer distinción del tipo de tallo (Ovalle y García, 2010). De cada tallo se tomó la sección basal y una vez etiquetados por parcela, se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del CP-Campus Tabasco.

Extracción y deposición de jugo en las membranas: De un entrenu-

do de cada tallo se extrajo el jugo en condiciones asépticas ejerciendo presión negativa y $2.5 \mu\text{l}$ se depositaron inmediatamente sobre una membrana de nitrocelulosa (Millipore 0.45 μm Cat. No. HAWG047S6) (Figura 1a). Una vez llenadas las celdas de la membrana se completó con $2.5 \mu\text{l}$ de dos extractos testigos, uno positivo y otro negativo, tomados como indicadores de la confiabilidad de la prueba de dicha membrana. Las muestras se fijaron a la membrana, mediante calor seco ($70 \pm 1^\circ\text{C}$) por 1 h con la ayuda de un horno (RIOSSA H-33) de acuerdo a lo descrito por (Ovalle y García, 2010).

Inmunoensayo: Todo el procedimiento serológico se realizó en agitación suave (50 xg) y a temperatura ambiente, siguiendo la metodología descrita por Comstock y Irey (1992) modificado por Ovalle y García (2010). Para fijar con proteína de lactosa los espacios libres de jugo de caña de la membrana, ésta se incubó por 1 h en 10 mL de solución búfer TBS (Tris HCL 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5) enriquecida con 2% (P/V) de leche en polvo descremada. Posteriormente, las membranas se enjuagaron durante 1 min en 10 mL de la solución pura del búfer TBS. Para fijar el primer anticuerpo, las membranas se incubaron en 10 mL de solución búfer TBS enriquecido con 1% (P/V) de leche en polvo, a la cual se le adicionó el anticuerpo anti-Lxx IgG Policlonal a una concentración de 1:5000. Una hora después se lavaron tres veces, durante 5 min en 10 mL de búfer TBS puro. Para fijar los anticuerpos de *L. xyli* subsp. *xyli* a las celdas de la membrana, se incubaron durante una hora en la solución búfer TBS con 1% (P/V) de leche y el anticuerpo secundario cabra IgG anti-conejo conjugado con Fosfatasa alcalina (SIGMA Cat.No. A8025) a una concentración de 1:10000. Seguidos de dos lavados, durante 15 min en 10 mL de la solución TBS. El revelado de las membranas se realizó por separado, en recipiente ámbar y en la cámara de extracción de gases a partir de 10 mL de la solución madre (Tris base 0.2 M, pH 9.1, más 0.3 g Naftol-AS-fosfato disuelto en 5 mL de Dimetilformamida), a los que se les adicionó 0.01 g de Fast Blue y 0.05 mL de MgCl_2 0.1M. y en agitación suave durante 20 min en la oscuridad. Después de enjuagar con agua destilada las membranas, se pasaron a una solución blanqueadora de hipoclorito de sodio a una concentración de 1.31% por 10 min, enjuagadas

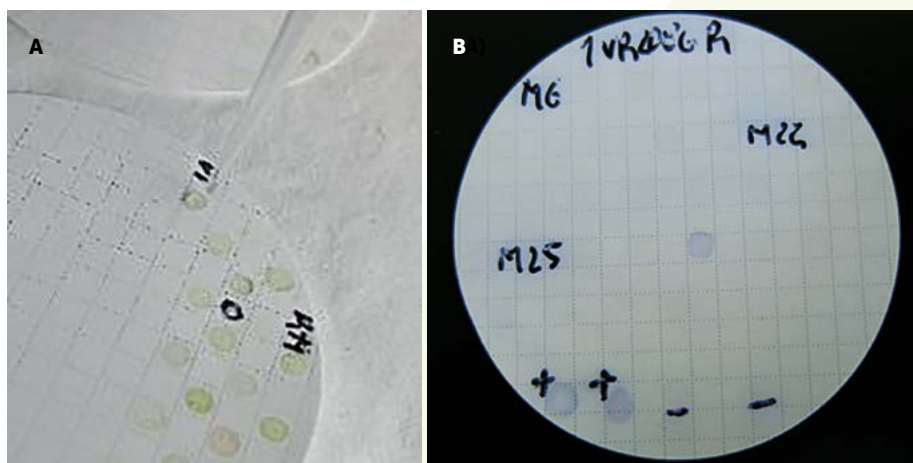


Figura 1. Deposición del jugo en las celdas en Membrana de nitrocelulosa (A). Membrana del inmunoensayo de adsorción de gota revelada mostrando las celdas azules del testigo positivo (+) y la de muestra 25 positiva al centro de la membrana. El resto de celdas son negativas como el testigo – (B).

con agua destilada y secadas entre papel filtro. Las lecturas de las celdas teñidas de azul, como en la celda del testigo positivo, indicarían la presencia de *L. xyly* subsp. *xyly* y se cuantificó como tallo positivo de la muestra, por sitio de muestreo, clon o condición ambiental y se emplearon para el cálculo de la incidencia de tallos infestados por muestra (Figura 1b).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el plano de la Figura 2, se presentan ubicados los 105 sitios de muestreo, diferenciándolos conforme a los resultados positivos del inmunoensayo de adsorción de gota (puntos verdes) y negativos (puntos negros). Así, cinco plantaciones muestreadas resultaron positivas, lo que indicó que la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli* está parasitando la caña cultivadas en la zona de estudio. Es relevante señalar que tres de los cinco sitios con resultado positivo se ubican a 3.5 km de distancia una de las otras, por lo que se considera un foco de la enfermedad. Otra plantación positiva se localizó hacia el centro de la parte sur, a 10 km, y la quinta plantación (sitio) positiva se ubicó al sureste a 25 km del foco, por lo que ambas plantaciones se tomaron como sitios de dispersión. Tomando en cuenta el valor de Índice de Morisita calculado ($I_\delta=7.5$) es mayor a 1, es decir el valor de $I_\delta > 1$ y la dispersión es agregada (Badii et al., 2011). Esto puede deberse a la llegada reciente de la bacteria a Tabasco, México y encontrarse en fase de dispersión, o que ya estaba presente y debido a que es parásito obligado y los largos periodos de cultivos de una misma plantación favorece a que la bacteria no se haya diseminada ampliamente, dado que su principal forma de propagación es a través de tallos infectados usados para siembras o a través de herramientas de corte (Ovalle et al., 2012). Estos resultados son sólidos, ya que la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli* en Gram positiva y no ha revelado variabilidad genética según reporta Young et al. (2006), en un estudio, utilizando 105 aislamientos de nueve países, es difícil encontrar que este anticuerpo policlonal se

acople con alguna otra bacteria fitopatógena presente en el jugo de la caña de azúcar, ya que todas las bacterias conocidas en este cultivo son Gram negativas. Además, presentan la ventaja de ser más tolerantes a cambios menores en el antígeno, como polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización (Narayanasamy, 2011).

Análisis por clon

Los resultados mostraron que de 210 muestras por clon (10 tallos/21 sitios) el clon Mex 79-431 fue negativa a la bacteria. Por el contrario los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11 mostraron resultados positivos. Los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 resultaron positivas en una muestra de uno de los 21 sitios; en tanto el clon RD 75-11 resultó positivo en cuatro muestras de dos de los 21 sitios muestreados, por lo que se sugiere que solo siete tallos de 1050 muestras analizadas resultaron positivas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo et al. (2009), quienes reportan la presencia de esta bacteria en Veracruz, México en los clones Mex 69-290, Mex

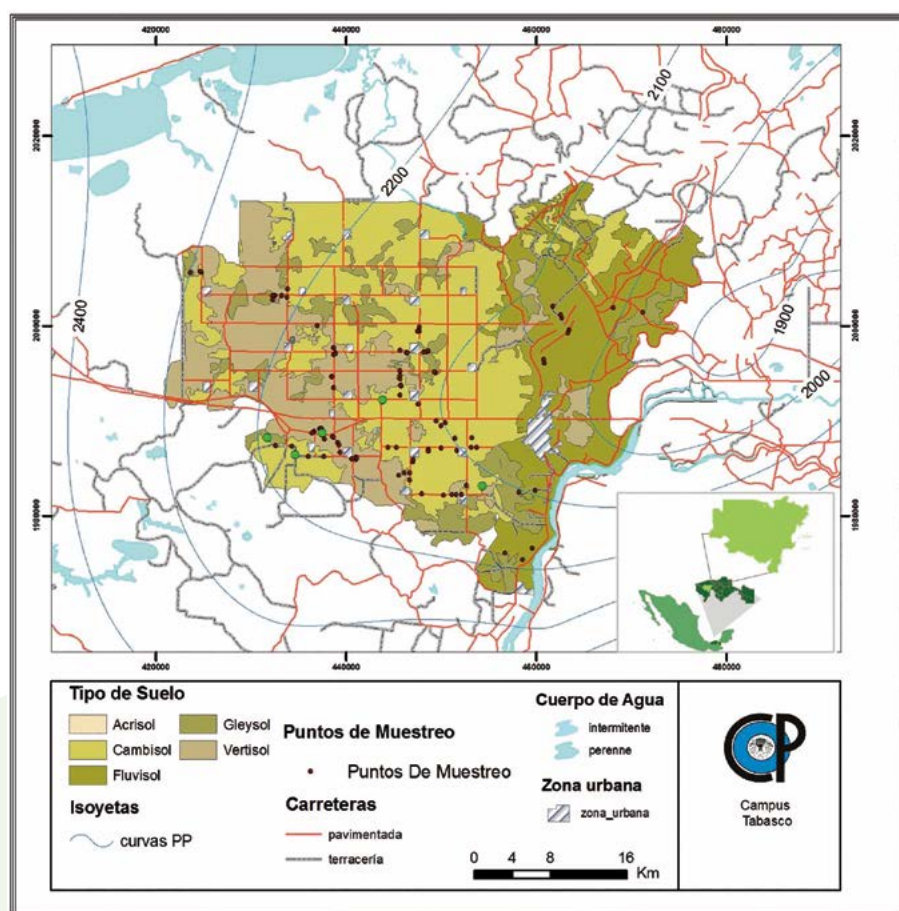


Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreos de *L. xyli* subsp. *xyli* y tipo de relación en el análisis serológico, puntos de muestreo positivos (verde) y puntos negativos color (café).

68-P-23, Mex 79-431, CP 72-2086 y RD 75-11. Asimismo, Comstock (2008) reportó al clon CP 72-2086 como tolerante, sin inducir pérdidas significativas del contenido de azúcar. Brumbley *et al.* (2006) señalan que *S. spontaneum* es un hospedero natural de *L. xyli* subsp. *xyli* y que desde el inicio del mejoramiento genético de la caña de azúcar, esta especie se hibridó con *S. officinarum*, en la década de 1920, para producir el primer clon híbrido moderno lo que reduce la proporción de clones resistentes a esta bacteria.

Análisis por tipo de suelo y régimen de lluvia

La bacteria *L. xyli* subsp. *xyli* se detectó en plantaciones con suelo Vertisol y Cambisol en dos plantaciones para cada tipo de suelo; en tanto que el suelo Gleysol sólo reveló un sitio positivo, y ninguna muestra positiva en suelo Fluvisol. Respecto a los sitios positivos y régimen pluvial, dos puntos fueron ubicados en precipitación baja (1793-1936 mm) y tres puntos en el régimen alto (1937-2085 mm). Los pocos sitios de muestreos positivos registrados no evidenciaron tendencia respecto la dispersión de la enfermedad y condiciones ambientales estudiadas. Sin embargo esta debe ser mínima dada el carácter de parásito obligado de la bacteria (Comstock, 2002; Davis, 1980); aunque Chinea *et al.* (2000) mencione expresiones severas de la enfermedad en condiciones de estrés hídrico y temperaturas altas.

Porcentaje de Incidencia de *L. xyli* ssp. *xyli* por clon

El Cuadro 1, muestra el porcentaje de la incidencia de *L. xyli* subsp. *xyli* detectada en las plantaciones de los sitios muestreados, por clon, tipo de suelo y régimen de lluvia. Se observó que la incidencia detectada varía en un rango de 10% a 30% tomando en cuenta los cinco sitios muestreados que resultaron positivas. Las plantaciones de los clones CP 72-2086, Mex 69-290 y Mex 68-P-23 mostraron incidencias de 10% en un solo sitio de muestreo respectivamente; en tanto que, las dos plantaciones positivas cultivadas del clon RD 75-11, mostraron incidencia de 10% y 30% en cada punto de muestreo.

Comstock (2002), menciona que las pérdidas en rendimiento debidas al raquitismo de la socas varían, dependiendo del clon, de las condiciones climatológicas y del grado de infección. Estos resultados coinciden parcialmente con Castillo *et al.* (2009) quienes calificaron mediante la técnica de tención de vasos por transpiración a los clones Mex 69-290 y Mex 68-P-23 como susceptibles al raquitismo de las socas. Sin embargo, deja entrever a

los clones Mex 79-431 y CP 72-2086 como tolerante, de igual manera que lo calificó Comstock, (2008). Aunque del clon RD75-11 no se tienen estudio de la respuesta genética al RSD, se consideró que tiene un nivel de susceptibilidad igual o mayor a los clones Mex 69-290 y Mex 68-P-23 dada la detección de dos plantaciones de este clon positivos e incidencia máxima del 30%. Con base a lo anterior se puede señalar que el bajo rendimiento de caña de azúcar la zona cañera estudiada señalada por Salgado *et al.* (2009), podría ser explicado parcialmente por efecto de *L. xyli* subsp. *xyli* patógeno del RSD. Por lo que se debe hacer un estudio global para determinar el impacto del RSD en la región, además de emplear clones resistentes o tolerantes a las condiciones climáticas de la zona estudiada, además de emplear material de siembra sano, tratado con termoterapia (desinfección térmica) por cultivo de tejidos, o provenientes de semilleros sanos certificados conforme a Victoria *et al.* (1997).

CONCLUSIONES

El método serológico de inmunoensayo de adsorción de gota resultó efectivo para detectar la presencia de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, parásito obligado de la caña de azúcar y agente causal del

Cuadro 1. Porcentaje de incidencia de *L. xyli* subsp. *xyli* en tallos de *Saccharum* sp. de cinco clones, cultivados en cuatro tipos de suelo y dos régimen de lluvia en 105 sitios de muestreo en Tabasco, México.

Suelo/Clon	Régimen de humedad (1793-1936 mm)										Régimen de humedad (1937-2085 mm)									
	Cambisol		Gleysol		Vertisol		Fluvisol				Cambisol		Gleysol		Vertisol		Fluvisol			
CP 72-2086	0	0	0	0	0	0	0	10	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 68-P-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 69-290	0	10	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 79-431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RD 75-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	30	0	0	10	0	0

Nota: NP=Suelo no presente en este régimen de humedad.

Raquitismo de las socas. Dicha bacteria de detectó infectando cepas en plantaciones de los clones CP 72-2086, Mex 68-P-23, Mex 69-290 y RD 75-11 con niveles de incidencia entre 0-30%, de la región cañera de la Chontalpa, Tabasco, México, y los sitios positivos representan focos de dispersión.

AGRADECIMIENTO

A los apoyos recibidos de las gerencias de los ingenios Presidente Benito Juárez y Santa Rosalía por los apoyos logísticos aportados. Así como al Grupo MASCAÑA-LPI-2: AESS del Colegio de Postgraduados por el financiamiento económico parcial.

LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Nueva York: Elsevier Academic Press. 903 p.
- Badii M.H., Guillen A., Cerna E., Landeros J. 2011. Dispersión Espacial: El Prerrequisito Esencial para el Muestreo. International Journal of Good Conscience. 6(1):40-71.
- Brumbley S.M., Petrasovits L.A., Hermann S.R., Young A.J., Croft B.J. 2006. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*: causal organism of ratoon stunting disease. Australasian Plant Pathology 35(6): 681-689.
- Castillo M.A., Rodríguez D.A.L., Herrera A.S., Enríquez V.R., Mayo R.L. 2009. Diagnóstico del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en los ingenios el Potrero y La Margarita. Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano. Universidad Veracruzana. pp 167-172.
- Chinea A., Nass H., Daboin C., Díez M.D. 2000. Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica. FonAP, INICA, FUNDAZUCAR, Universidad de los Andes. Barquisimeto, Venezuela. 108 p.
- Comstock J.C. 2008. Sugarcane yield loss due to ratoon stunt. Journal Association Sugar Cane Technologists: 28: 22-31.
- Comstock J.C. 2002. Ratoon stunting disease. Sugar Technology. 4(2): 1-6.
- Comstock J.C., Irey M.S. 1992. Detection of the leaf scald pathogen (*Xanthomonas albilineans*) using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. Plant Disease 76: 103-105.
- Davis M.J. 1980. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. Science 210: 1365-1367.
- Davis M.J., Bailey R.A. 2000. Ratoon stunting. In: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A., Bailey, J. C. Comstock, B. J., Croft, A.S. Saumtally. (eds). Charter: Diseases caused by bacteria. pp: 49-54.
- Davis M.J., Gillaspie A.G.Jr., Vidaver A.K., Harris R.W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. Int. Journal Systematic Bacteriology 34: 107-117.
- Evtushenko L.I., Dorofeeva L.V., Subbotin S.A., Cole J.R., Tiedje J.M. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 371-380.
- Flores C.S. 1997. Las Enfermedades de la Caña de Azúcar en México. Núñez (Ed). Córdoba, Veracruz, México. 285 p.
- Gao S.J., Pan Y.B., Chen R.K., Chen P.H., Zhang H., Xu L.P. 2008 Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. Sugar Tech 10: 334-340.
- Gillaspie A.G., Teakle D.S. 1989. Ratoon stunting disease. In: Diseases of Sugarcane; Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie, Jr., and C. G. Hughes. (eds). Elsevier Science Publishing, Inc., New York. pp: 59-80.
- Grisham M.P., Pan Y.B., Richard Jr. E.P. 2007. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Leaves by Real Time Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 91: 430-434.
- Harrison N.A., Davis M.J. 1988. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. Journal of Phytopathology. 78 722-727.
- Hoy J.W., Flynn J.L. 2001. Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 24: 417-421.
- Hoy J.W., Grisham M.P., Damann K.E. 1999. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. Plant Disease. 83: 1170-1175.
- INFOCAÑA. 2014. Lista de boletines. Disponible en línea en: http://www.infocana.gob.mx/lista_boletines.php?t=1
- Locci R. 1994. Actinomycetes as plant pathogens. European Journal of Plant Pathology, Kluwer academic publisher. Netherlands. 100: 179-200.
- Moore P.H., Paterson A.H., Tew T. 2014. Sugarcane: The Crop, the Plant, and domestication. In: Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology. P. H. Moore, C. B. Frederyk (eds). Word and agriculture series pp: 1-17.
- Narayanasamy P. 2011. Detection of Bacterial and Phytoplasmal Pathogens. In: Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis. Bacterial and Phytoplasmal Pathogens, Volume 2. Department of Plant Pathology Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India. 256 p.
- Ovalle W. 2012. Enfermedades de la caña de azúcar. En: El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala. M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, R. Espinosa. (eds). Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Guatemala. pp 233-258.
- Ovalle W., García S. 2008. Efecto de la enfermedad del Raquitismo de las socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) en el rendimiento de caña de nueve variedades en cinco cortes. 2004-2008. En: Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2007-2008. CENGICAÑA, Guatemala. pp 89-93.
- Ovalle W., García S. 2010. Incidencia de patógenos en semilleros de caña de azúcar en la zafra 2009-2010: In: Memoria de presentación de resultados de investigación. CENGICAÑA. Guatemala. Pp 127-132.
- Rao I., Singh G. 2000. Serological Diagnosis of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane in India. Sugar tech. 2(4): 35-36.
- Salgado S., Palma D., Zavala J., Lagunes L., Castelán M., Ortiz C., Juárez J., Armida L., Rincon J. 2009. Sistema integrado para

- recomendar dosis de fertilizantes en caña de azúcar (SIRDF): Ingenio Presidente Benito Juárez. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco, México. 81 p.
- Shen W.K., Zhou G.H., Deng H.H., Zhou L.Y. 2006. Detection of sugarcane ratoon stunting disease pathogen with polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequence analysis. Chinese Agricultural Science Bulletin. 22(1): 413-416.
- Silva R.H.V. 2013. Enfermedades Bacterianas Asociadas a Caña de Azúcar. Revista Mexicana de Fitopatología. 31: 63-64.
- Victoria J.I., Viveros C., Cassalet C., Calderón H. 1997. Establecimiento de semilleros limpios, serie técnica No. 22. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA). Cali, Colombia. 19 p.
- Young A.J., Petrasovits L.A., Croft B. J., Gillings M., Brumbley S.M. 2006. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). Australasian Plant Pathology. 35: 503-511.

